

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-044891
(43)Date of publication of application : 25.02.1988

(51)Int.Cl. C12P 7/40
//C12P 7/40
C12R 1:645)

(21)Application number : 62-015920 (71)Applicant : SUNTORY LTD
(22)Date of filing : 28.01.1987 (72)Inventor : SHINMEN YOSHIJI
YAMADA HIDEAKI
SHIMIZU AKIRA

(30)Priority

Priority number : 61 71270 Priority date : 31.03.1986 Priority country : JP

(54) PRODUCTION OF ARACHIDONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce arachidonic acid or arachidonic acid-containing lipid in high yield and in a short time, by cultivating a microorganism belonging to the genus *Mortierella* in a medium having a hydrocarbon, fatty acid, fatty acid salt or fats and oils.

CONSTITUTION: A preculture solution of a microorganism such as *Mortierella* elongate SAM0219, *Mortierella exigua* IF08571, etc., belonging to the genus *Mortierella*, capable of producing arachidonic acid, is inoculated into a liquid or a solid medium and cultivated. Production of arachidonic acid can be increased by adding a hydrocarbon such as hexadecane, etc., a fatty acid such as oleic acid, etc., or fats and oils such as olive oil, coconut oil, etc. Arachidonic acid-containing lipid is obtained by solvent extraction from the mold.

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-44891

⑫ Int. Cl. 4	識別記号	室内整理番号	⑬ 公開 昭和63年(1988)2月25日
C 12 P 7/40		7236-4B	
/(C 12 P 7/40			
C 12 R 1/40)			審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 アラキドン酸の製造方法

⑮ 特願 昭62-15920

⑯ 出願 昭62(1987)1月28日

優先権主張 ⑰ 昭61(1986)3月31日 @日本 (JP) @特願 昭61-71270

⑱ 発明者 新免 芳史 京都府乙訓郡大山崎町門明寺鳥居前8の1 S-304

⑲ 発明者 山田 秀明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1

⑳ 発明者 清水 昌 京都府京都市中京区西の京伯楽町14

㉑ 出願人 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

㉒ 代理人 弁理士 青木 朗 外5名

明細書

1. 発明の名称

アラキドン酸の製造方法

2. 特許請求の範囲

1. モルティエレラ (*Mortierella*) 属に属しアラキドン酸産生能を有する微生物を培養してアラキドン酸、又はアラキドン酸を含むる脂質を生成せしめ、そしてアラキドン酸を採取することを特徴とするアラキドン酸の製造方法。

2. 培養開始前の培地に炭化水素、脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 培養中の培養液に脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)
 本発明は醸酵法によるアラキドン酸の製造方法に関する。

(従来の技術)

従来から、微生物によるアラキドン酸の生産方法としては、炭素源として、炭水化合物、又は炭化水素を用い、微生物として、ベニシリューム (*Penicillium*) 属、ロードトルラ (*Rhodotorula*) 属、又はフザリヌーム (*Fusarium*) 属に属する微生物を使用する方法が報告されている(特公昭56-19231, 56-19232, 56-19233 を参照のこと)。

しかしながら、いずれの方法においても収量が低く、または培養時間が多く、あるいは、工程が複雑である。

また、モルティエレラ (*Mortierella*) 属の微生物を用いるアラキドン酸の製造方法は知られていない。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、従来アラキドン酸を生産する能力を有することが知られていなかったモルティエレラ属微生物を使用して、安価な常用の培地を用いて、

従来法より短い培養時間で、高収率で、しかも単純な工程でアラキドン酸を製造することができる方法を提供しようとするものである。

(問題点を解決するための手段)

上記の目的はモルティエレラ属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸、又はアラキドン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてアラキドン酸を採取することを特徴とするアラキドン酸の製造方法により達成される。

(具体的在說明)

本発明においては、モルティエレラ属に属し、アラキドン酸生産能を有する酵母であれば、すべて使用することができる。このような微生物として、例えばモルティエレラ・エランガタ (*Mortierella elongata*) IPO 8570、モルティエレラ・エキシア (*Mortierella exisia*) IPO 8571、モルティエレラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hirsutissima*) IPO 5941等を挙げることができる。

これらの菌株はいずれも、財団法人醸酵研究所からなんら制限なく入手することができる。

また、本発明者らが土壤から分離した菌株モルティエレラ・エロンガタ SAM 0219(微生物研究会寄第1239号)を使用することもできる。

次に、上記の商標 SAM 0219(微研条寄第1239号)の商標的性質を記載する。

各培地における生育状態

培养条件: 25℃、暗黑下

1. 麦芽エキス寒天培地

コロニーの生育は良好、培養 2 日目のコロニーは直径 28-31mm、培養 5 日目のコロニーは直径 65-72mm、コロニーは淡乳白色を呈する、気管系の発達は乏しい、胞子のう胞子の形成は良好、胞子のう胞子は気管系より生じる、二重ニクに類似した臭いあり。

2. バヒイショ・ブドウ園那木地

コロニーの生育は良好、培養2日目のコロニーは直径27-31mm、培養5日目のコロニーは直径75-80mm、コロニーはバラの花状を呈す。

(3)

(4)

る、コロニー中心部で気菌糸が著しく発達する、コロニーの裏側は黄白色あるいは黄色、胞子のう胞子の形成は不良、ニンニクに類似した臭いあり、臭いはやや強い。'

3. シアベック寒天培地

コロニーの生育は比較的良好、培養2日目のコロニーの直径は22-24mm、培養5日目のコロニーの直径は50-53mm、気菌糸の発達は乏しい、気菌糸が密にからまうことがある。胞子のう胞子の形成は非常に良好、胞子のう胞子は気菌糸より生じる。ニンニクに懸濁した黒いあり。

4. LCA寒天培地（培地の調製方法は、三浦宏一郎、工藤光代著“水生不完全菌のための一寒天培地”日本菌学会会報11卷、116-118

コロニーの生育は良好、培養 2 日目のコロニーの直徑は 27.9mm²、培養 5 日目のコロニーは直徑 64.66mm²、コロニーは捲葉状を呈する。気管糸の発達はコロニーの中心部を駿いて乏

しい、胞子のう胞子の形成は良好。胞子のう柄は気菌糸より生じる。ニンニクに類似した臭いあり。

检校机密

各培地の検鏡標本およびコロニーの直接検鏡で、胞子のう柄、胞子のう柄の分岐の仕方、胞子のう、胞子のう胞子などを観察した。

- 胞子のう柄は長さ87.5 - 320 μ m、幅は基部で3 - 7.5 μ m、先端に向て先細り、1.0 - 2.5 μ mとなる。胞子のう柄はしばしば基部で分岐する。胞子のうは球形で、直径15 - 30 μ m、内部に多数の胞子のうを含む。隕落後からその不明瞭なカバーを残す。胞子のうは孢子は楔形形、若く時に腎臍形表面は平滑、7.5 - 12.5 \times 5 - 7.5 μ m。厚膜孢子は比較的多量に形成される。単胞、第3に連鎖することがある。時に数本の菌糸を周間に出すことがある。楔形並み三角形、12.5 - 36 \times 7.5 - 15 μ m。または直径12.5 - 15 μ m。接合孢子は観察されない。

15

CEV

3. 生理的性質

最適生育条件

pH: 6 ~ 9

温度: 20 ~ 30 °C

生育の範囲

pH: 4 ~ 10

温度: 5 ~ 40 °C

以上の菌学的特徴に従い本発明の菌株 (S A M - 0219) の分類学的位置の検索を、J. A. van Arx, "The Genera of Fungi sporulating in Pure Culture," 3rd ed., J. Cramer, 1981およびE. K. Donnoch, W. Gams, & T.-H. Anderson, "Compendium of Soil Fungi," Academic Press, 1980に準拠して求めると、胞子のう柄の先端に球状の胞子のうを形成する、柱軸を持たない、胞子のう胞子に付属系がない、堆養菌系がニンニクに類似した臭いを発する、ということから本菌株は *Mortierella* 属に属する眞菌であると考えられる。

そこで、W. Gams, "A key to the species of *Mortierellales*," Persoonia 9, 381 ~ 391, 1977に準

じして既知の *Mortierella* 種の種類と菌学的特徴を比較すると、本菌株はコロニーがビロード状でない、培養菌糸がニンニクに類似した臭いを発する、胞子のう柄が長さ 87.5 ~ 320 μm で分枝は下部でのみ生じ、菌索の原状に分枝しない、胞子のうは内部に多数の胞子のう胞子を含む、といふことから *Mortierella* 属 *Mortierella* 壓属 (Sugars, *Mortierella*) *Hyphophilia* 菌 (Sect. *Hyphophilia*) に含まれると考えられる。 *Hyphophilia* 菌には 22 種が含まれている。本菌株とこれら 22 種と菌学的特徴を比較すると、本菌株は *Mortierella* *archaea*, *M. elongatula*, および *M. elegans* の 3 種に類似すると考えられる。そこで、E. K. Donnoch, W. Gams, & T.-H. Anderson, "Compendium of Soil Fungi," Academic Press, 1980, および W. Gams, "Some new or noteworthy species of *Mortierella*," Persoonia 9, 111 ~ 140, 1977、および G. Linnemann, "Mortierella," Coenensis 1863, H. Zycha & R. Siepmann, "Mucorales Elias Bechreibung aller Gattungen und Arten dieser

(7)

(8)

Pilzgruppe," pp. 155 ~ 140, J. Cramer, 1989を参考にして、本菌株とこれら 3 種と菌学的特徴を比較した。本菌株は、*M. elongata* とは胞子のう柄の長さと基部の幅、胞子のうの大きさで、明瞭に異なる。*M. elongata* とは胞子のう胞子の形態と大きさで、明瞭に異なる。*M. elegans* とは胞子のう柄がやや短い、厚膜胞子の形態が横円形または亜球形でときに連続することがあり、さらに厚膜胞子がときに数本の菌糸を周間に出す、という点で異なるが、本発明者はこのような差異は本菌株を *Mortierella elongata* と別種であるとするには十分ではないと判断した。そこで、本発明者は本菌株を *Mortierella elongata* SAM 0219 と同定した。SAM 0219 株は昭和 61 年 3 月 19 日に農商産業省工業技術院微生物工業技術研究所 (FRI) に受託番号 FERI RP-1239として寄託されている。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の胞子、菌糸又はため培养して得られた前培养液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース

ス、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一概的に使用されているもののがいずれも使用できるが、これらに混ざるものではない。炭素源としてはベブトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カゼイミン酸、コーンステイブリカ等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アノモニウム等の無機窒素源を用いることができる。この他必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量窒素源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は 0.1 ~ 3.0 重量%、好ましくは 1 ~ 1.0 重量%、窒素源は 0.01 ~ 5 重量%、好ましくは 0.1 ~ 2 重量%の濃度とするのが良い。又、培養温度は 5 ~ 40 °C、好ましくは 20 ~ 30 °C とし、培地の pH は 4 ~ 10、好ましくは 5 ~ 9 として、通気搅拌培養、振盪培養、又は静置培養を行なう。培養は通常 2

(9)

(10)

～10日間行う。

固体培地で培養する場合は、固形物重量に対し50～100重量%の水を加えたふすま、もみがら、米ぬか等を用い、5～40℃で、好ましくは20～30℃の温度において、3～14日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養素を加えることができる。

アラキドン酸の生産量を増加せしめるためには、培地中にヘキサデカンもしくはオクタデカンのごとき炭化水素；オレイン酸もしくはリノール酸のごとき脂肪酸又はその塩、例えばナトリウム塩もしくはカリウム塩；又はオリーブ油、練乳油もしくはヤシ油のごとき油脂類を単独で、又は組み合わせて存在せしめるのが好ましい。これらの添加物は培養開始前の培地又は培養中の培養液に添加することができる。これらの添加物は一度に添加することもでき、又は連続的に、もしくは複数回に分けて経時的に添加することもできる。培養開始前においては炭化水素、脂肪酸もしくはその塩、又は油脂類の添加が好ましく、培養中においては

脂肪酸もしくはその塩、又は油脂類の添加が好ましい。

このように培養して、菌体内に、アラキドン酸を含有する脂質が生成蓄積される。液体培地を使用した場合には、培養菌体から、次のようにしてアラキドン酸の抽出を行なう。

培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。菌体は十分水洗し、好ましくは乾燥する。乾燥は減圧乾燥、風乾等によって行なうことができる。乾燥菌体は、好ましくは密閉気流下で有機溶媒によつて抽出処理する。有機溶度としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、またメタノールと石油エーテルの交互抽出や、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によつても良好な結果を得ることができます。抽出物から被圧下で有機溶媒を留去することにより、高濃度のアラキドン酸を含有した脂質が得られる。

(11)

(12)

また、上記の方法に代えて菌体を用いて抽出を行うことができる。この場合にはメタノール、メタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とから成る水に対する相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

上記のようにして得られた脂質中には、アラキドン酸が脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これを、直接分離することもできるが、低級アルコールとのエステル。例えばアラキドン酸メチルとして分離するのが好ましい。このようなエステルにすることにより、他の脂質性分から容易に分離することができ、また、培養中に生成する他の脂肪酸、例えばバルミチン酸、オレイン酸、リノール酸等（これらも、アラキドン酸のエステル化してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、アラキドン酸のメチルエ斯特を得るには、前記の抽出脂質を無水メタノール-塩酸5%～10%、BF₃-メタノール10%～50%等により、室温にて

1～2時間処理するのが好ましい。

前記の処理液からアラキドン酸メチルエ斯特を回収するにはヘキサン、エーテル、酢酸エチル等の有機溶剤で抽出するのが好ましい。次に、この抽出液を無水硫酸ナトリウム等により乾燥し、有機溶媒を好ましくは被圧下で留去することにより主として脂肪酸エ斯特から成る混合物が得られる。この混合物中に、目的とするアラキドン酸メチルエ斯特の他に、バルミチン酸メチルエ斯特、ステアリン酸メチルエ斯特、オレイン酸メチルエ斯特等が含まれている。これらの脂肪酸メチルエ斯特混合物からアラキドン酸メチルエ斯特を単離するには、カラムクロマトグラフィー、恒温結晶化法、尿素包挿法等を、単離で、又は組み合わせて使用することができる。

こうして単離されたアラキドン酸メチルからアラキドン酸を得るには、アルカリで加水分解した後、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出すればよい。

また、アラキドン酸をそのメチルエ斯特を經

(13)

(14)

ないで採取するには、前記の抽出脂質をアルカリ分解（例えば5%水酸化ナトリウムにより室温にて2~3時間）した後、この分解液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

実施例1

グルコース5%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%及び麦芽エキス0.3%を含む培地(pH6.0)5.0mLを500mL容皿口フラスコに入れ、120°Cで20分間殺菌した。モルティエレラ・エロンガタ_{SAH 0219}(FERM BP-1239)1白金耳を接種し、レシジョシェーカー((110rpm)により2.8°Cで5日間振盪培養した。培養後、滤過によって固体を回収し、十分水洗した後、滤液乾燥した。これにより、1.3gの乾燥固体を得た。この固体より、クロロホルム-メタノール-水の三層系の溶媒を用いるBligh & Dyerの抽出法によって総脂質を抽出したところ、320mgの脂質が得られた。この脂質を無

水メタノール-塩酸(95:5)を用いて2.0°Cにて3時間処理してアラキドン酸のメチルエステル化を行なった。これをエーテルで抽出して200mgの脂肪酸メチルを得た。この脂肪酸メチルの組成はガスクロマトグラフィーによる分析で、バルミチン酸メチル9%、ステアリン酸メチル2%、オレイン酸メチル3.2%、リノール酸メチル9%、ヨーリノレン酸メチル1.0%、アラキドン酸メチル2.1%、その他1.7%であることが認められた。この混合脂肪酸メチルをカラムクロマトグラフィーによって分離し、アラキドン酸メチル画分を分取し、ローカリーエバボレーターによって溶液を留去した結果、2.5mgの精製されたアラキドン酸メチルを得た。本標品と市販のアラキドン酸メチル標準サンプルについて、ガスクロマトグラフィー分析及び質量分析によって比較を行なったところ、両者は、いずれの分析においても一致した。精製前及び精製後の「アラキドン酸メチル」量は培地当たり、それぞれ0.84mg/mL、0.50mg/mL、乾燥固体当たり、

(15)

(16)

それぞれ3.2mg/g、1.9mg/gであった。

実施例2

実施例1と同じ組成の培地5Lを1.5kgジャーファーメンターに仕込み、120°Cで40分間殺菌後、モルティエレラ・エロンガタ_{SAH 0219}(FERM BP-1239)200gを接種した。3.0°C、通気量0.5v.v.e.で3日間恒温振盪培養を行ない、得られた固体350g(乾燥重量110g)について、実施例1と同様に抽出・水分解・メチルエステル化を行なったところ、純脂質2.9g、混合脂肪酸メチル1.8gを得た。このものの組成は、バルミチン酸メチル8%、ステアリン酸メチル1%、オレイン酸メチル2.3%、リノール酸メチル1.2%、ヨーリノレン酸メチル1.1%、アラキドン酸メチル2.2%、その他1.7%であることが認められた。アラキドン酸メチルの生成量は培地当たり、0.79g/L、乾燥固体当たり3.6mg/gであった。

又、培養終了後、滤過によって得られた培養液(350mL)を乾燥後、実施例1と同様に抽出・加水分解・メチルエステル化を行なったところ、

2.5%のアラキドン酸メチルを含む混合脂肪酸メチル158mgを得た。

実施例3

モルティエレラ エキシクア(*Mortierella exiguus*, IPO 8571)、及びモルティエレラ ヒゲロフィカ(*Mortierella hyperborea*, IPO 5941)について実施例1と同様な操作を行なったところ、それぞれ2.1mg、9.5mgの脂肪酸メチルを得た。

これらの脂肪酸メチル中に含まれるアラキドン酸メチルを単離・精製したところ、それぞれ1.2mg、及び2.0mgであった。

実施例4

グルコース2%、酵母エキス1%、Tween 20 0.2%、及び種々の炭化水素、脂肪酸ナトリウム、又は油酸0.5%を含む培地(pH 6.0)2.0mLを100mL容マイラーに入れ、120°Cで20分間殺菌した。モルティエレラ・エロンガタ_{SAH 0219}(FERM BP-1239)1白金耳を接種し、ローカリーシェーカー(200rpm)により2.8°Cで5日間培養した。得られた固体について、実施例1と同様に抽出・加水

(17)

(18)

分解、及びメチルエステル化を行なった。培地に添加した種々の炭化水素、脂肪酸ナトリウム、及び油脂それらについて、得られた乾燥菌体量、乾脂質量、乾脂酸メチル量、アラキドン酸メチル含量、及び培地当たりのアラキドン酸メチル生成量は下表のようになつた。

添加物	乾細菌 体量 (mg)	脂肪質 (mg)	乾脂肪酸 ナトリウム (mg)	アラキドン酸 メチル含量 (%)	アラキドン酸の 培地当たり生産量 (mg/m²)
オクタデカノン	330	95	88	20	0.88
オレイン酸ナトリウム	250	81	64	25	0.80
リノール酸ナトリウム	300	96	83	19	0.79
オリーブ油	450	130	113	24	1.36
植物油	420	118	97	23	1.12
ヤシ油	350	98	78	25	0.98
無添加	300	85	68	22	0.75

(19)

(20)

添加物	アラキドン酸 (mg/m²)	
オレイン酸ナトリウム	46	0.79
リノール酸ナトリウム	47	0.80
リノレン酸ナトリウム	54	0.76
オリーブ油	44	0.96
大豆油	53	1.12
アマニ油	48	0.95
無添加	49	0.74

培養途中(培養4日後)に、脂肪酸、油脂類などを添加することにより、対照無添加よりも、アラキドン酸生成量は10~60%上昇した。

手 続 準 正 書 (自免)

昭和62年6月8日

特許庁長官 黒田明雄殿

1. 事件の表示

昭和62年特許第015920号

2. 発明の名称

アラキドン酸及びこれを含有する脂質の
製造方法(新名称)

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (190)サントリー株式会社

4. 代 理 人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

新光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名・弁理士(6579)青木 周 (文書
印鑑) (外5名)

5. 補正により帶加する説明の段

(21)

6. 补正の対象

- (1) 明細書の「発明の名称」の欄
 (2) 明細書の「特許請求の範囲」の欄
 (3) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄
7. 补正の内容
- (1) 明細書の発明の名称の欄を「アラキドン酸^{アラキドン酸}及びこれを含有する脂質の製造方法^{アラキドン酸}」に補正する。
 (2) 特許請求の範囲を別紙の通りに補正する。
 (3) 明細書第1頁第1行目、及び第3頁第2行目「アラキドン酸」を「アラキドン酸及びこれを含有する脂質」に補正する。
 (4) 同第3頁第10行目「製造方法」を「製造方法：及びモルティエラ属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸を含むる脂質を生成せしめ、それを採取することを特徴とするアラキドン酸を含有する脂質の製造方法」に補正する。
 8. 領件審査の目録

特許請求の範囲

1 頁

2. 特許請求の範囲

1. モルティエラ (*Mortierella*) 属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸、又はアラキドン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてアラキドン酸を採取することを特徴とするアラキドン酸の製造方法。
 2. 培養開始前の培地に炭化水素、脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。
 3. 培養中の培養液に脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。
 4. モルティエラ (*Mortierella*) 属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてそれを採取することを特徴とするアラキドン酸を含有する脂質の製造方法。
 5. 培養開始前の培地に炭化水素、脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の方法。

(2)

(1)

6. 培養中の培養液に脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の方法。

(2)